

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Kristina Krželj**

**Doziranje varfarina prema  
farmakogenetičkom algoritmu u  
bolesnika s fibrilacijom atrijske, plućnom  
embolijom i dubokom venskom  
trombozom**

**DIPLOMSKI RAD**



**Zagreb, 2018.**

Ovaj ekvivalent diplomskom radu izrađen je na Klinici za bolesti srca i krvnih žila, Klinici za unutarnje bolesti i u Kliničkoj jedinici za farmakogenomiku i individualizaciju terapije Kliničkog bolničkog centra Zagreb pod vodstvom prof.dr.sc. Martine Lovrić Benčić i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2017./2018. Rad je pod naslovom *Warfarin dosing according to the genotype-guided algorithm is most beneficial in patients with atrial fibrillation: a randomized parallel group trial* objavljen 27.veljače 2018. godine u časopisu Therapeutic Drug Monitoring koji se indeksira u current contentsu (CC).

## Popis kratica

<b>CI</b>	(od engl. <i>confidence interval</i> ) interval pouzdanosti
<b>DVT</b>	duboka venska tromboza
<b>FA</b>	fibrilacija atrijsa
<b>FDA</b>	(od engl. <i>Food and Drug Administration</i> ) Američka agencija za hranu i lijekove
<b>INR</b>	(od engl. <i>international normalized ratio</i> ) međunarodni normalizirani omjer
<b>NPHG</b>	kontrolna skupina kojoj je varfarin doziran prema standardnoj kliničkoj praksi
<b>OR</b>	(od engl. <i>odds ratio</i> ) omjer izgleda
<b>PCR</b>	(od engl. <i>polymerase chain reaction</i> ) lančana reakcija polimeraze
<b>PE</b>	plućna embolija
<b>PHG</b>	skupina kojoj je varfarin doziran prema nalazima farmakogenetičkog testiranja
<b>SD</b>	standardna devijacija

## Sadržaj

Sažetak.....	I
Summary.....	II
Uvod.....	1
Ispitanici i metode.....	2
Rezultati.....	5
Rasprava.....	9
Zaključak.....	13
Literatura.....	14
Životopis.....	18

## Sažetak

### Doziranje varfarina prema farmakogenetičkom algoritmu u bolesnika s fibrilacijom atrijske, plućnom embolijom i dubokom venskom trombozom

**Uvod:** Opservacijske studije su pokazale potencijalnu korist doziranja varfarina prema rezultatima genotipizacije za CYP2C9 i VKORC1 gene, no dosadašnji randomizirani klinički pokusi još uvijek donose oprečne rezultate. Jedan od uzroka kontradiktornih rezultata je zanemarivanje razlika u indikacijama za primjenu varfarina. Cilj ove studije jest odrediti učinkovitost i sigurnost doziranja varfarina prema farmakogenetičkom i kliničkom algoritmu u pacijenata s fibrilacijom atrijske (FA), plućnom embolijom (PE) i dubokom venskom trombozom (DVT) unutar prvih pet dana nakon započinjanja terapije.

**Ispitanici i metode:** Provedena je randomizirana, jednostruko slijepa studija jednog centra. Analizirano je 205 pacijenata obaju spolova, starijih od 18 godina s dijagnozom FA, PE ili DVT. Ispitanici su podijeljeni u dvije skupine. Jednoj skupini varfarin je doziran prema nalazima genotipizacije (PHG skupina), dok je drugoj skupini varfarin doziran prema kliničkim parametrima (NPHG skupina). Genotipizacija je provedena metodom lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu (Real-Time PCR). Primarni ishodi bili su vrijeme unutar terapijskog raspona međunarodnog normaliziranog omjera INR (od engl. *international normalized ratio*) (2,0-3,0) i postotak pacijenata koji su postigli stabilnu antikoagulaciju definiranu kao INR između 2,0 i 3,0 u najmanje dva uzastopna mjerenja.

**Rezultati:** U pacijenata s FA postotak vremena provedenog u terapijskom rasponu INR-a bio je veći u PHG skupini (medijan=26% (SD 25,0)) nego u NPHG skupini (medijan=14% (SD 18,6)), (delta=12; 95% interval pouzdanosti (CI) 0-23; p=0,040). Nije pronađena statistički značajna razlika u drugim indikacijama za terapiju varfarinom. Stabilne doze varfarina postignute su u statistički značajno većeg broja pacijenata u PHG skupini 14/30 (43%), nego u NPHG skupini 7/32 (22%) (OR=3,13, 95% CI 0,92-10,98; p=0,039).

**Zaključak:** Doziranje varfarina prema rezultatima genotipizacije za CYP2C9 i VKORC1 gene djelotvornije je u pacijenata s FA. Nema dokaza za takav zaključak u pacijenata s PE i DVT.

**Ključne riječi:** varfarin, fibrilacija atrijske, CYP2C9, VKORC1, međunarodni normalizirani omjer (INR)

## Summary

### **Warfarin dosing according to the genotype-guided algorithm is most beneficial in patients with atrial fibrillation: a randomized parallel group trial**

**Background:** Observational studies have indicated potential benefits of CYP2C9 and VKORC1 guided dosing of warfarin, but randomized clinical trials have resulted in contradictory findings. One of the reasons for contradiction may be the negligence of possible differences between warfarin indications. This study aims to determine the efficacy and safety of genotype- and clinically-guided dosing of warfarin in atrial fibrillation (AF), deep-vein thrombosis (DVT), and pulmonary embolism (PE) within the first five days after the introduction of therapy.

**Patients and Methods:** In this single-center, single-blinded, randomized, controlled trial including patients of both sexes,  $\geq 18$  years of age, diagnosed with AF, DVT, or PE, a total of 205 consecutive patients were allocated into the group where warfarin therapy was genotype-guided (PHG), and where it was adjusted according to the clinical parameters (NPHG). Genotyping of CYP2C9\*2, \*3 and VKORC1 was performed using the Real-Time PCR method. The primary outcomes were the percentage of time in the therapeutic international normalized ratio (INR) (2.0-3.0) range and the percentage of patients who achieved a stable anticoagulation defined as the INR (2.0-3.0) range in at least two consecutive measurements.

**Results:** In patients with AF, the percentage of time spent in the therapeutic range of INR was higher in the PHG group (mean=26% (SD 25.0)) than in the NPHG group (mean=14% (SD 18.6)), ( $\Delta=12$ ; 95% confidence interval (CI) 0-23;  $p=0.040$ ). There was no significant difference in the other two indications for warfarin treatment. A stable dose of warfarin was achieved in a statistically higher number of patients in the PHG group 14/30 (47%) than in the NPHG group 7/32 (22%) (OR=3.13, 95% CI 0.92-10.98;  $p=0.039$ ).

**Conclusion:** CYP2C9 and VKORC1 genotype-guided dosing of warfarin may be beneficial in patients diagnosed with atrial fibrillation. There is no evidence for such a conclusion in patients with DVT and PE.

**Keywords:** warfarin, atrial fibrillation, CYP2C9, VKORC1, international normalized ratio (INR)

## Uvod

Zbog uskog terapijskog raspona varfarina, postoji velika interindividualna razlika u optimalnoj dozi (između 0,6 i 15,5 mg/dan) potrebnoj za terapijsku antikoagulaciju. (1-3) Pri vrijednostima međunarodnog normaliziranog omjera INR (engl. *international normalized ratio*) ispod 2,0 povećan je rizik za trombozu, dok je pri vrijednostima INR iznad 4,0 povećan rizik za teško krvarenje. (4,5) Doza varfarina ovisi o mnogim čimbenicima uključujući dob, spol, prehranu, druge lijekove i postojeće pridružene bolesti. (6,7) Polimorfizmi gena za CYP2C9 (uključenog u metabolizam farmakološki potentnijeg S-enantiomera varfarina) i VKORC1 (uključenog u ciklus vitamina K), (8,9) zajedno s dobi i tjelesnom površinom utječu do 50% na varijabilnost u individualnoj dnevnoj dozi varfarina. (10) Prema nekim studijama, na varijabilnost terapijske doze kliničke značajke utječu s udjelom od 12%, CYP2C9 s udjelom od 20%, dok CYP2C9 i VKORC1 zajedno imaju udio od 50%. (11-13)

Smatra se da bi se uključivanjem rezultata genotipizacije gena CYP2C9 i VKORC1 u procjenu početne doze varfarina mogao smanjiti rizik za razvoj nuspojava, skratiti vrijeme do postizanja stabilne doze varfarina i vrijeme za postizanje terapijskog raspona koagulacijskih parametara. Iako je Američka agencija za hranu i lijekove FDA (od engl. *Food and Drug Administration*) još 2004. godine donijela preporuke za genotipizaciju prije uključivanja varfarina u terapiju, još uvijek postoje kontroverze o prednostima genotipizacijom vođenog doziranja u odnosu na doziranje prema kliničkim parametrima. Neki autori naglašavaju manjak relevantnih randomiziranih pokusa koji dokazuju prednost doziranja prema rezultatima genotipizacije u odnosu na doziranje prema standardnoj kliničkoj praksi. Neke opservacijske studije su pokazale moguću korist doziranja varfarina prema rezultatima genotipizacije za gene CYP2C9 i VKORC1, no prema nedavno objavljenim randomiziranim studijama još uvijek postoje oprječni rezultati. (14,15) Moguće objašnjenje za oprječnost rezultata su različite indikacije za primjenu terapije varfarinom. Pirmohamed i suradnici (14) su pokazali značajno poboljšanje u svim ishodima (postotak vremena u terapijskom rasponu, vrijeme potrebno za postizanje terapijskog raspona INR (2,0) i vrijeme potrebno za postizanje stabilnih doza, incidencija ekscesivne antikoagulacije (INR>3,0) i broj potrebnih prilagodbi doze). Kimmel i suradnici (15) nisu potvrdili ove nalaze. Spomenute dvije studije (14,15) bile su provedene na različitim populacijama. Pored drugih važnih razlika, u skupini kojoj je varfarin doziran prema rezultatima genotipizacije u studiji

Pirmohameda i suradnika, (14) bilo je 72% bolesnika s dijagnozom fibrilacije atrijske (FA), dok je u studiji Kimmela i suradnika (15) bilo samo 23% takvih pacijenata. U studiji Pirmohameda i suradnika (14) bilo je 28% bolesnika s dubokom venom trombozom (DVT), dok je u studiji Kimmela i suradnika (15) bolesnika s istom dijagnozom bilo 56% . U studiji Kimmela i suradnika, (15) bio je nepoznat broj bolesnika s plućnom embolijom, (PE) dok u Pirmohamedovoj studiji (14) nije uopće bilo pacijenata s PE. Studija Kimmela i suradnika (15) nije razlikovala pacijente s DVT od pacijenata s PE, nego ih je svrstala u istu skupinu. U studiji koju su proveli Schwarz i suradnici (16) objavljenoj u N Engl J Med 2014. godine, autori su zaključili da je doziranje varfarina prema rezultatima genotipizacije za gene CYP2C9 i VKORC1 bilo su superiorno u bolesnika s FA u odnosu na ispitanike s DVT, s jasnom prednošću farmakogenetičkog pristupa pacijentima koji su bili nositelji dvaju ili više CYP2C9 i VKORC1 polimorfnih alela.

Unatoč eri terapije novim oralnim antikoagulantima (NOAC) ili izravnim oralnim antikoagulantima (DOAC), još uvijek postoji značajan broj pacijenata s FA kod kojih je liječenje NOAC-ima i DOAC-ima kontraindicirano (npr. bolesnici s bubrežnom insuficijencijom ili bolestima srčanih zalistaka). Osim toga, važno je istaknuti da je postizanje terapijskog INR (ciljani raspon između 2,0-3,0) od najveće važnosti u bolesnika s FA i mehaničkim valvulama. Utvrđeno je da interakcije među lijekovima predstavljaju vodeći uzrok prekomjerne antikoagulacije prilikom terapije DOAC-ima.

Potaknuti spomenutim istraživanjima, (14-16) ciljevi naše studije bili su istražiti može li poznavanje genotipa CYP2C9 i VKORC1 pomoći u predviđanju doze varfarina u svrhu brzog postizanja terapijskog učinka, održavanja stabilnih doza i INR-a te smanjenja broja nuspojava.

## **Ispitanici i metode**

Studija je provedena u Kliničkom bolničkom centru Zagreb kao prospektivna randomizirana i jednostruko slijepa studija u razdoblju od rujna 2012.godine do lipnja 2016.godine. Studijski protokol odobrilo je Etičko povjerenstvo Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Studija je usklađena s Helsinškom deklaracijom (17) i anonimnost ispitanika je zaštićena dodjeljivanjem brojevanih šifri umjesto imena svakom pojedinom ispitaniku tijekom cijele studije i analize.



Ciljana populacija bili su pacijenti obaju spolova, stariji od 18 godina, s dijagnozom FA, PE ili DVT, primljeni u hitnu službu Kliničkog bolničkog centra Zagreb. Isključni kriterij bila je dijagnoza maligne bolesti u anamnezi. U studiju je uključeno 209 pacijenata prema redoslijedu njihova prijema u hitnu službu (slika 1. Dijagram tijeka).

Pacijenti su randomizirani u dvije skupine. Randomizacija pacijenata provedena je u hitnoj službi prema mjestu njihova prijema. Prije započinjanja antikoagulacijske terapije pacijentima primljenim na Kliniku za bolesti srca i krvnih žila nije provedena farmakogenetička procjena, dok je pacijentima primljenim na Kliniku za internu medicinu prije početka antikoagulacijske terapije provedena farmakogenetička evaluacija. U skupini kojoj je varfarin doziran prema nalazu farmakogenetičkog testiranja (PHG) bilo je 106 ispitanika, dok je u skupini kojoj je varfarin doziran prema standardnoj kliničkoj praksi (NPHG) bilo 99 ispitanika. Ispitanici nisu znali kojoj skupini pripadaju. Protokol terapije varfarinom bio je isti u obje skupine ispitanika. Nuspojave su bilježene za vrijeme hospitalizacije i kontrolnih posjeta. Pacijenti koji su razvili nuspojave bili su praćeni do potpunog oporavka.

Koristeći algoritam doziranja varfarina s neprofitne web stranice <http://www.WarfarinDosing.org> odredili smo početnu dozu varfarina vođenu prema nalazu genotipizacije, uvodeći strategiju postupnog određivanja doze za svakog pacijenta u PHG skupini tijekom prvih dva do pet dana, a nakon tog perioda ispitanicima je doza prilagođena prema rezultatima INR-a. U kontrolnoj NPHG skupini tijekom prvih dva do pet dana liječenja varfarin je uveden u fiksnoj dozi od 2 tablete po 3 mg (6 mg) varfarina, a nakon toga doza lijeka je prilagođena prema izmjerenim vrijednostima INR-a.

INR je ponavljano mjereno pacijentima kojima je bilo potrebno, ovisno o prethodnim INR vrijednostima, a za potrebe studije INR je mjereno na određene dane (pri prijemu, prvi dan uvođenja terapije, nakon 48 sati, nakon 72 sata i na 5., 7., 14. i 21. dan). U analizu je bilo uključeno i šest mjerenja koagulacijskih parametara tijekom pet dana liječenja kao i podatci dobiveni na dan otpusta iz bolnice.

Nuspojave terapije varfarinom klasificirane su u dvije skupine. Prva skupina je uključivala manja krvarenja poput asimptomatske mikrohemorurije, blažih gingivalnih ili vaginalnih krvarenja i supkutanih hematoma. Druga skupina je uključivala veća krvarenja (velika intracerebralna krvarenja, opsežna urogenitalna ili gastrointestinalna krvarenja).

Primarni ishodi bili su postotak vremena u terapijskom INR (2,0-3,0) rasponu i postotak pacijenata koji su postigli stabilnu antikoagulaciju definiranu kao terapijski INR (2,0-3,0) raspon u najmanje dva uzastopna mjerenja. Sekundarni ishodi bili su postotak pacijenata s postignutim stabilnim dozama i incidencija nuspojava. Rezultati genotipizacije prije započinjanja terapije varfarinom bili su poznati samo u PHG skupini.

Genomska DNA je izolirana iz uzorka pune krvi koristeći BioSprint 15 DNA Blood Kit (Qiagen, Hilden, Germany) na KingFisher mL sustavu (Thermo LabSystems, Vantaa, Finska). Genotipizacija za CYP2C9 i VKORC1 učinjena je pomoću Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR sustava, prema uputama proizvođača (Applied Biosystems, CA, SAD) koristeći validirani TaqMan® Drug Metabolism Genotyping test (Applied Biosystems, CA, SAD). Identifikacijske oznake testa bile su sljedeće: VKORC1 1173C>T (rs 9934438) ID C\_30204875\_10, CYP2C9\*2 (rs1799853) ID C\_25625805\_10, CYP2C9\*3 (rs1057910) ID C\_271074892\_10. Svi pokusi su provedeni u pločicama s 96 jažica pod istim uvjetima: 2 minute na 50 ° C, 10 minuta na 95 ° C, nakon 50 ciklusa od 15 s na 92 ° C s 90 s na 60 ° C produženog vremena. Za svaki pojedinačni nukleotidni polimorfizam SNP (od engl. *single nucleotide polymorphism*), 25 ul PCR reakcijske smjese po jažici sastojalo se od 1,25 ul mješavine TaqMan® Drug Metabolism Genotyping testa (specifično za svaki polimorfizam), 12,5 ul mješavine TaqMan® Universal PCR Master i 5-20 ng genomske DNA, razrijeđeno u 11,25 ul dH<sub>2</sub>O.

Provedena je *intention-to-treat* analiza. Statistička značajnost razlike u postotku vremena provedenog unutar terapijskog INR raspona 2,0-3,0 analizirana je Studentovim t-testom. Prikazali smo prosječne razlike između skupina kojima je varfarin doziran prema genotipu i prema standardnoj kliničkoj praksi. Također smo pokazali 95% intervale pouzdanosti (CI) tih srednjih razlika. Omjeri vjerojatnosti s 95% CI su dani kao mjere standardiziranih veličina učinka za postizanje stabilnih doza i nuspojava, izračunati serijom univarijatnih binarnih logističkih regresija. U svim slučajevima, razina dvostrane značajnosti bila je  $p < 0,05$  s intervalom pouzdanosti na razini 95%. Statistička analiza podataka provedena je pomoću NCSS 11 statističkog softvera (2016; NCSS, LLC, Kaysville, Utah, SAD).

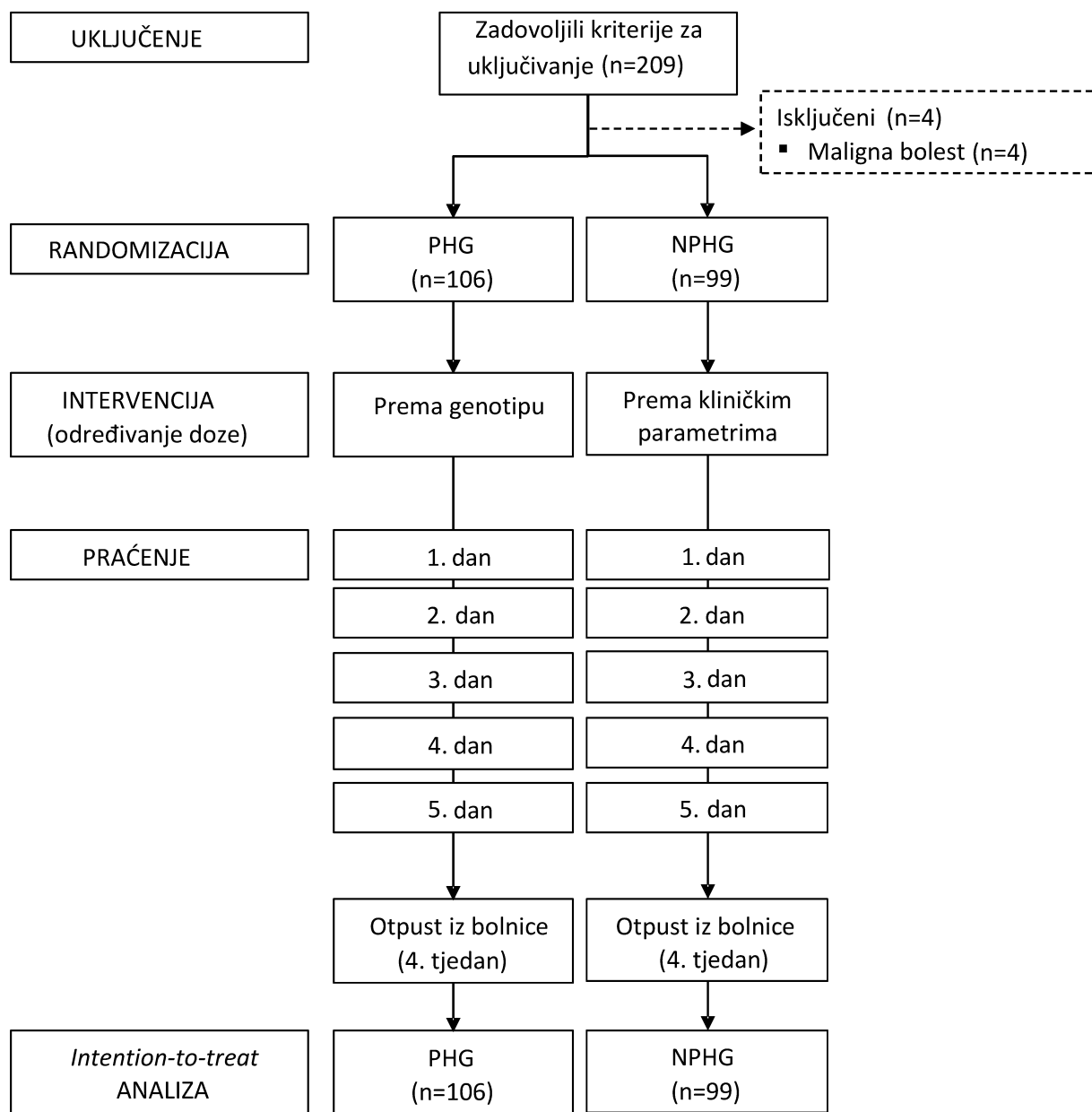
## Rezultati

Ukupno je bilo 209 pacijenata procijenjenih kao kandidati za uključanje u studiju. Konačno je uključeno 106 pacijenata u PHG, a 99 u NPHG skupinu (slika 1). Spomenute su skupine bile usporedive s obzirom na dob, spol, indeks tjelesne mase, pušenje, konzumaciju alkohola i laboratorijske parametre (tablica 1). U obje skupine učestalost indikacije za primjenu varfarina bila je ista. Najčešća indikacija za hospitalizaciju u obje skupine bila je DVT, a slijede FA i PE (tablica 1).

Doze varfarina prilagođavane su tijekom prvih pet dana. U tom razdoblju 45 (42,5%, 95% CI 33,3% -51,5%) bolesnika je postiglo su terapijski INR (2,0-3,0) raspon i 61 bolesnik (57,5%, 95% CI 48,5% -66,7%) nije. Nije bilo statistički značajne razlike u postotku vremena provedenom u terapijskom INR rasponu, postotku pacijenata koji su postigli stabilnu dozu varfarina i u broju nuspojava između dviju studijskih skupina. Međutim, kada su uspoređene podskupine prema dijagnozi kao indikaciji za primjenu varfarina, statistički značajna korist doziranja varfarina prema algoritmu temeljenom na farmakogenetici utvrđena je u skupini bolesnika s FA, koji su bili statistički značajno dulje u terapijskom INR intervalu ( $\Delta = 12$ ; 95% CI 0-23;  $p = 0.040$ ). Veći udio ispitanika s FA iz skupine PHG je postigao stabilnu dozu varfarina od ispitanika s FA iz skupine NPHG (tablica 2.) Nije utvrđena nikakva značajna korist od prema genotipu vođenog algoritma doziranja varfarina kod bolesnika s DVT i PE.

Nije utvrđena statistički značajna razlika u nuspojavama ( $\chi^2 = 0,170$ ;  $df = 1$ ;  $p = 0,801$ ) niti u incidenciji krvarenja ( $\chi^2 = 0,288$ ;  $df = 1$ ;  $p = 0,673$ ) između dviju studijskih skupina. U 14 bolesnika zabilježene su sljedeće nuspojave: krvarenje u 6 pacijenata (3 bolesnika s hematurijom, 2 bolesnika s mikrohematurijom i 1 bolesnik s epistaksom), retromboza u 3 bolesnika, prekomjerna antikoagulacija u 3 pacijenta i proljev u 2 bolesnika. Nije bilo značajnih razlika u ukupnom broju zabilježenih nuspojava, niti u krvarenju između PHG i NPHG skupine.

Ispitanici s FA iz skupine PHG imali su više od dva puta veći izgled za postizanje stabilne antikoagulacije od bolesnika s drugim dijagnozama (OR = 2.37, 95% CI = 1.00-5.62,  $p = 0.049$ ), dok su ispitanici s DVT imali su 45% niži izgled (OR = 0,65; 95% CI = 0,30-1,42;  $p = 0,275$ ) (tablica 3.). Univarijatna analiza također je potvrdila statistički značajnu povezanost između postizanja terapijskog INR raspona i FA.



Slika 1. Dijagram tijeka

Tablica 1. Demografske osobine bolesnika (ispitanika) obje skupine

	PHG skupina (n=106)	NPHG skupina (n=99)
Dob (godine)	70 (53-77)	73 (59-81)
Spol, n (%)		
Muškarci	55 (51.9)	43.4 (43.4)
Žene	51 (48.1)	56.6 (56.6)
Indeks tjelesne mase (ITM)*	27 (24-30)	26 (23-29)
Pušenje, n (%)	16 (15.1)	11 (11.1)
Alkohol, n (%)	14 (13.2)	9 (9.1)
Indikacija za varfarin, n (%)		
Fibrilacija atrijske	30 (28.3)	32 (32.2)
Duboka venska tromboza	62 (58.5)	61 (61.6)
Plućna embolija	16 (15.1)	24 (24.2)
Aspartat aminotransferaza	23 (18-29)	24 (19-34)
Alanin aminotransferaza	25 (17-36)	22 (14-34)
Gama-glutamilttransferaza	30 (18-51)	31 (19-64)
Bilirubin	13 (9-20)	11 (8-16)
Urea	6 (4-8)	5 (4-7)
Kreatinin	97 (85-118)	102 (90-124)

Podatci su prikazani kao medijan (interkvartilni raspon) ako nije drugačije navedeno

Kratice: PHG – pokusna farmakogenetička skupina /doza varfarina određena je prema rezultatima genotipizacije; NPHG – kontrolna skupina/doza varfarina određena je prema kliničkim parametrima

\* Indeks tjelesne mase je izračunat prema formuli  $\text{kg/m}^2$

Tablica 2. Najvažniji ishodi prvih 5 dana od uvođenja varfarina

	PHG (n=106)	NPHG (n=99)	Učinak	95% CI	p
Ukupni uzorak					
% vremena s adekvatnim INR (2.0-3.0)	14 (19.2)	16 (19.9)	$\Delta$ -2	(-7-4)	0.513
Postignute stabilne doze*	22 (20.8)	22 (22.2)	OR 0.92	(0.45-1.88)	0.798
Nuspojave	8 (7.5)	6 (6.1)	OR 1.54	(0.44-5.63)	0.464
Fibrilacija atrijsa					
% vremena s adekvatnim INR (2.0-3.0)	26 (25.0)	14 (18.6)	$\Delta$ 12	(0-23)	0.040
Postignute stabilne doze*, n (%)	14 (46.7)	7 (21.9)	OR 3.13	(0.92-0.98)	0.039
Nuspojave	3 (10.0)	2 (6.3)	OR 1.67	(0.2-15.67)	0.588
Duboka venska tromboza					
% vremena s adekvatnim INR (2.0-3.0)	11 (16.1)	16 (20.2)	$\Delta$ -6	(-12-1)	0.083
Postignute stabilne doze*, n (%)	8 (12.9)	14 (23.0)	OR 0.5	(0.17-1.41)	0.146
Nuspojave	4 (6.5)	2 (3.3)	OR 2.03	(0.3-16.73)	0.414
Plućna embolija					
% vremena s adekvatnim INR (2.0-3.0)	18 (25.0)	21 (19.0)	$\Delta$ -3	(-18-11)	0.637
Postignute stabilne doze*, n (%)	4 (24.0)	7 (29.2)	OR 0.81	(0.15-4.15)	0.772
Nuspojave	1 (6.3)	2 (8.3)	OR 0.73	(0.02-11.96)	0.806

Podaci su prikazani kao srednja vrijednost (standardna devijacija) ako nije drukčije navedeno  
 Kratice: PHG – pokusna farmakogenetička skupina /doza varfarina određena je prema rezultatima genotipizacije; NPHG – kontrolna skupina/doza varfarina određena je prema kliničkim parametrima; OR = omjer rizika za postizanje stabilne doze ili nuspojava u PHG skupini;  $\Delta$  = srednja razlika između PHG i NPHG skupine; CI = interval pouzdanosti; p = statistička značajnost

\* Stabilna doza = doza pri kojoj je INR bio u rasponu 2,0-3,0 u najmanje dva mjerenja

Tablica 3. Postizanje stabilne antikoagulacije (INR 2,0-3,0 u najmanje dva mjerenja) do otpusta iz bolnice (samo PHG skupina; n=106)

	Stabilna antikoagulacija	OR (95% CI)	p
Fibrilacija atrijska	17 (56.7)	2.37 (1.00-5.62)	0.049
Duboka venska tromboza	23 (37.1)	0.65 (0.30-1.42)	0.275
Plućna embolija	7 (43.8)	1.11 (0.38.-3.26)	0.844

\* Podatci su prikazani kao broj (postotak) ispitanika

Kratice: OR = Omjer rizika za postizanje stabilne antikoagulacije izračunat pomoću tri nezavisne binarne logističke regresije; CI = interval pouzdanosti; p = statistička značajnost omjera rizika

## Rasprava

U ovom istraživanju utvrđena je bolja regulacija antikoagulacije na terapiji varfarinom u pacijenata s FA u ranim fazama liječenja kojima je varfarin doziran prema genotipu u usporedbi s doziranjem varfarina temeljenom na standardnoj kliničkoj praksi. U bolesnika s PE i DVT nije pronađena nikakva razlika između standardne kliničke prakse u doziranju varfarina i doziranja varfarina prema nalazima genotipizacije.

Pirmohamed i suradnici (14) su uspoređivali dva algoritma doziranja varfarina, ali samo u bolesnika s FA i DVT. Primarni ishod bio je postotak vremena u terapijskom INR rasponu tijekom 12 tjedana nakon započinjanja terapije varfarinom. Njihovi rezultati su jasno pokazali da genotipizacija prije primjene oralne antikoagulacijske terapije skraćuje vrijeme za postizanje adekvatnog INR raspona i vrijeme za postizanje stabilne doze, smanjuje broj potrebnih prilagodbi doze, produljuje vrijeme unutar terapijskog INR raspona i smanjuje učestalost prekomjerne antikoagulacije. Važno je napomenuti da je u ovoj studiji (14) genotipizacija provedena pomoću uređaja "*point-of-care*" koji se obično primjenjuje u bolnicama širom svijeta i u ambulantnoj kontroli antikoagulacije. Ovaj uređaj nije u širokoj primjeni u Hrvatskoj. Prednost naše studije je u uključivanju dodatnih kliničkih parametara, kao što su funkcije jetre i bubrega, praćene u svih ispitanicima. U istraživanju Pirmohameda i suradnika (14) funkcije drugih organa koje mogu utjecati na dozu varfarina nisu bile uzete u obzir.

Studija COAG koju su proveli Kimmel i suradnici, (15) navodi potpuno suprotne zaključke u vezi s ulogom algoritma doziranja temeljenog na genotipu u započinjanju terapije varfarinom. Primarni ishod ove studije (15) bio je postotak vremena unutar odgovarajućih INR vrijednosti od kraja intervencije do kraja četvrtog tjedna. Ova studija (15) je utvrdila da između prosječnog vremena u terapijskom INR rasponu nije bilo značajne razlike između obaju skupina, ali su otkrili značajnu povezanost između rase i doziranja algoritma. Ovdje spomenute studije (14,15) nisu usporedive zbog brojnih čimbenika koji bi mogli značajno utjecati na konačne rezultate. Različit pristup doziranju varfarina i razlika u etničkoj pripadnosti ispitanika vrlo je važna. U studiji COAG, (15) udio afroameričkih ispitanika bio je 25%, a genetske varijante među različitim rasama mogu utjecati na doziranje varfarina i pridonijeti različitim rezultatima u spomenuta dva istraživanja. (18,19)

Naše je istraživanje provedeno u bolničkim uvjetima s boljom suradljivošću pacijenata, dok su gore navedene studije uključile i izvanbolničke pacijente. Ova razlika također može utjecati na kvalitetu kliničkih ishoda, jer prema nekim studijama do 50% pacijenata samoinicijativno mijenja doze varfarina, što predstavlja značajnu razliku između ambulantnih pacijenata i bolničkih pacijenata koji obično pokazuju veću suradljivost.

Pengo i suradnici (20) su također uspoređivali dva algoritma doziranja varfarina, ali samo u bolesnika s nevalvularnom FA tijekom prvih 19 dana liječenja varfarinom. Primarni ishodi su bili broj izmjerenih INR vrijednosti izvan terapijskog raspona ( $INR < 2,0$  ili  $> 3,0$ ) i postotak vremena provedenog u terapijskom rasponu. U ovoj studiji (20) nije utvrđena statistički značajna razlika u postotku vremena u terapijskom rasponu između pokusne farmakogenetičke skupine (varfarin doziran prema algoritmu temeljenom na rezultatima genotipizacije) i kontrolne skupine (varfarin doziran prema standardnoj kliničkoj praksi), ali je zabilježen značajno manji postotak vremena provedenog s vrijednostima  $INR > 4.0$  u farmakogenetičkoj skupini (0.7%, 95% CI 0.4-1.4) u odnosu na kontrolnu skupinu (1.8%, 95% CI 0.4-3.3) (prilagodba prema Bonferroniju  $p = 0.02$ ). U farmakogenetičkoj skupini Pengo i suradnici (20) su koristili vlastiti, prethodno razvijen i validiran farmakogenetički algoritam doziranja varfarina koji je temeljen na demografskim i genetskim obilježjima bjelačke populacije. (21) Taj se algoritam razlikuje od prethodno primijenjenih algoritama, jer su Pengo i suradnici (20) u farmakogenetičkoj analizi osim CYP2C9 i VKORC1 određivali i CYP4F2 genotip.



U nedavno objavljenom članku Wena i suradnika (22) autori su usporedili farmakogenetički algoritam doziranja varfarina s dva klinička algoritma u bolesnika s FA i tromboembolijskim događajima među ispitanicima iz kineske populacije Han. Ukupno je ispitano 320 bolesnika koji su slučajnim odabirom raspoređeni u tri skupine: u skupinu kojoj je varfarin doziran prema farmakogenetičkom algoritmu, skupinu koja je liječena prema tajvanskom algoritmu i skupinu s tzv. optimalnom kliničkom skrbi. Kontrola INR-a bila je češća u skupini s tzv. optimalnom kliničkom skrbi nego u skupini koja je primala varfarin prema Tajvanskom algoritmu, stoga je skupina s optimalnom kliničkom skrbi predstavljala kontrolnu skupinu. Primarni ishod bio je postotak vremena u terapijskom području tijekom prvih 90 dana terapije varfarinom. Primarni ishod ove studije (22) bio je postotak vremena u terapijskom rasponu INR-a tijekom prvih 90 dana terapije varfarinom. Wen i suradnici (22) su otkrili da uporaba genotipom vođenog doziranja varfarina ne poboljšava primarni ishod. Tijekom prvog tjedna liječenja, dvije skupine kojima je varfarin doziran prema kliničkoj praksi (skupina kojoj je doziranje vođeno prema Tajvanskom algoritmu i kontrolna skupina) imale su 20% veći postotak vremena u terapijskom rasponu INR od farmakogenetičke skupine. U našoj studiji je utvrđeno da se postotak vremena provedenog u terapijskom INR rasponu nije bitno razlikovao između PHG i NPHG skupine, ali smo zabilježili bolji antikoagulacijski učinak u ranoj fazi terapije varfarinom u skupini PHG nego u NPHG skupini.

Studija koju su proveli Gong i suradnici (23) pokazala je da je inicijalna doza varfarina od posebnog značaja za bolesnike s DVT jer su bolesnici s tom dijagnozom pokazali veću rezistenciju na terapijski učinak varfarina u odnosu na bolesnike s dijagnozom FA. Postoji zabrinutost oko inicijalnih doza jer neki pacijenti mogu biti pod većim rizikom za pretjeranu antikoagulaciju i krvarenje. Potrebno je stoga više informacija obzirom na kliničku korist genotipom vođenih algoritama za određivanje inicijalnih doza kao i jesu li takvi algoritmi od koristi za specifične populacije pacijenata koji zahtijevaju veće doze varfarina. (24)

Primijetili smo da je FA snažan prediktor postizanja terapijskog INR raspona, što je u skladu s rezultatima objavljenim u studiji Schwarza i suradnika (16) u kojoj autori potvrđuju da je genotipom vođeno doziranje varfarina na temelju genotipa CYP2C9 i VKORC1 bilo superiornije u bolesnika s FA u usporedbi s bolesnicima s venskom tromboembolijom. Moguća patofiziološka podloga za ovakve rezultate može se barem djelomično objasniti

varijabilnošću u aktivnosti CYP enzima. Osim u jetri, CYP enzimi su pronađeni u glatkim mišićima krvnih žila, endotelnim stanicama ljudske aorte i koronarnim arterijama. (19, 25-27) U ljudskom srcu, CYP2C9, kao i CYP2C8 i CYP2J2 su uključeni u metabolizam arahidonske kiseline i generiraju epoksieikozatrienoičnu kiselinu (EET), koja bi trebala imati zaštitni učinak na krvne žile, posreduju u širenju koronarnih arterija, smanjuju upalu u krvožilnom sustavu i povećavaju intravaskularnu fibrinolizu. (28-31) Genetske varijante tih enzima mogu rezultirati značajnim razlikama u vaskularnom odgovoru i povećati rizik infarkta miokarda i poremećaj kardiovaskularne homeostaze, a sve to može biti podloga za razvoj FA. Zbog svoje važne uloge u kardiovaskularnoj homeostazi, daljnja istraživanja ekspresije i funkcije enzima CYP2C9 mogu pridonijeti boljem razumijevanju etiologije i liječenja kardiovaskularnih bolesti. Nadalje, različiti rezultati našeg istraživanja između ispitanika s različitim indikacijama za terapiju varfarinom mogu se objasniti činjenicom da je u DVT već započeta koagulacijska kaskada, dok je terapija varfarinom u FA preventivna.

## **Ograničenja studije**

Prvo ograničenje predmetne studije je da nije učinjena genotipizacija za kontrolnu skupinu kojoj je doziranje varfarina bilo vođeno prema standardnoj kliničkoj praksi. Stoga ne možemo tvrditi da su dvije skupine (NPHG i PHG) usporedive na početku u odnosu na genetske varijante. Naši ishodi bili su zasnovani na INR-u i protrombinskom vremenu umjesto na antikoagulaciji i ozbiljnosti krvarenja. Ovo smo ograničenje poštivali tijekom rasprave. Sve naše ključne reference koristile su isto za primarne ishode. Nismo zabilježili vrijeme u danu kad su pacijenti uzimali varfarin, iako je prema nedavno objavljenim rezultatima pokazano da odabir vremena u danu može utjecati na praćene ishode.(32) Ovo je bilo istraživanje u koje su uključeni bolesnici samo iz jednog centra, što sprječava generalizaciju dobivenih rezultata.

## **Zaključak**

Značajna korist doziranja varfarina prema farmakogenetičkom algoritmu opažena je u podskupini bolesnika s FA. Postotak vremena provedenog u terapijskom rasponu i postotak postizanja stabilne doze bio je znatno veći u bolesnika s FA u usporedbi s ispitanicima kojima je doziranje varfarina zasnovano samo na kliničkim parametrima. U bolesnika s PE i DVT takve prednosti prema genotipu određene doze varfarina nisu pronađene. Zbog nedostatka jasnih dokaza o uporabi farmakogenetike u svrhu prevencije komplikacija, naročito u prevenciji krvarenja i poboljšanju kliničkih ishoda u terapiji varfarinom, provedena studija ukazuje na važnost izvođenja randomiziranih kliničkih pokusa radi razjašnjenja ovog problema.

## Literatura

1. Yin T, Miyata T. Warfarin dose and the pharmacogenomics of CYP2C9 and VKORC1 - rationale and perspectives. *Thromb Res.* 2007;120:1-10.
2. Owen RP, Gong L, Sagreiya H, Klein TE, Altman RB. VKORC1 pharmacogenomics summary. *Pharmacogenet Genom.* 2010; 20:642-644.
3. Issac MS, El-Nahid MS, Wissa MY. Is there a role for MDR1, EPHX1 and protein Z gene variants in modulation of warfarin dosage? A study on a cohort of the Egyptian population. *Mol Diagn Ther.* 2014;18:73-83.
4. Kearon C, Ginsberg JS, Kovacs MJ, Anderson DR, Wells P, Julian JA i sur. Comparison of low-intensity warfarin therapy with conventional-intensity warfarin therapy for long-term prevention of recurrent venous thromboembolism. *N Engl J Med.* 2003;349:631-639.
5. Levine MN, Raskob G, Landefeld S, Kearon C. Hemorrhagic complications of anticoagulant treatment. *Chest.* 2001;119:108-121.
6. Takahashi H, Wilkinson GR, Caraco Y, Muszkat M, Kim RB, Kashima T. Population differences in S-warfarin metabolism between CYP2C9 genotype-matched Caucasian and Japanese patients. *Clin Pharmacol Ther.* 2001;70:159-164.
7. Loebstein R, Yonath H, Peleg D, Almog S, Rotenberg M, Lubetsky A, i sur. Interindividual variability in sensitivity to warfarin-nature or nurture. *Clin Pharmacol Ther.* 2003;73:253-263.
8. Pirmohamed M, James S, Meakin S, Green C, Scott AK, Walley TJ, i sur. Adverse drug reactions as cause of admission to hospital: prospective analysis of 18 820 patients. *BMJ.* 2004;329:15-19.
9. Jorgensen AL, FitzGerald RJ, Oyee J, Pirmohamed M, Williamson PR. Influence of CYP2C9 and VKORC1 on patient response to warfarin: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2012;7:e44064.

10. Johnson JA, Gong L, Whirl-Carrillo M, I sur. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guidelines for CYP2C9 and VKORC1 genotypes and warfarin dosing. *Clin Pharmacol Ther.* 2011;90:625-629.
11. Hillman MA, Wilke RA, Yale SH, Vidaillet HJ, Caldwell MD, Glurich I, i sur. A prospective, randomized pilot trial of model-based warfarin dose initiation using CYP2C9 genotype and clinical data. *Clin Med Res.* 2005;3:137-145.
12. Geisen C, Watzka M, Sittlinger K, Steffens M, Daugela L, Seifried E, i sur. VKORC1 haplotypes and their impact on the inter-individual and inter-ethnic variability of oral anticoagulation. *Thromb Haemost.* 2005;94:773-779.
13. Sconce EA, Khan TI, Wynne HA, Avery P, Monkhouse L, King BP, i sur. The impact of CYP2C9 and VKORC1 genetic polymorphism and patient characteristics upon warfarin dose requirements: proposal for a new dosing regimen. *Blood.* 2005;106:2329-2333.
14. Pirmohamed M, Burnside G, Eriksson N, Jorgensen AL, Toh CH, Nicholson T, i sur. A randomized trial of genotype-guided dosing of warfarin. *N Engl J Med.* 2013;369:2294-2303.
15. Kimmel SE, French B, Kasner SE, Johnson JA, Anderson JL, Gage BF, i sur. A pharmacogenetic versus a clinical algorithm for warfarin dosing. *N Engl J Med.* 2013;369:2283-2293.
16. Schwarz UI, Kim RB, Tirona RG. Genotype-guided dosing of vitamin K antagonists. *N Engl J Med.* 2014;370:1761-1762.
17. Association WM. World Medical Association Declaration of Helsinki, ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA.* 2013;310:2191-2194.
18. Visser LE, van Schaik RH, Jan Danser AH, Hofman A, Witteman JC, van Duijn CM, i sur. The risk of myocardial infarction in patients with reduced activity of cytochrome P450 2C9. *Pharmacogenet Genomics.* 2007;17:473-479.

19. Delozier TC, Kissling GE, Coulter SJ, Dai D, Foley JF, Bradbury JA, i sur. Detection of human CYP2C8, CYP2C9, and CYP2J2 in cardiovascular tissues. *Drug Metab Dispos.* 2007;35:682-688.
20. Pengo V, Zambon CF, Fogar P, Padoan A, Nante G, Pelloso M, i sur. A randomized trial of pharmacogenetic warfarin dosing in naive patients with non-valvular atrial fibrillation. *PLoS One.* 2015;10:e0145318.
21. Zambon CF, Pengo V, Padrini R, Basso D, Schiavon S, Fogar P, i sur. VKORC1, CYP2C9 and CYP4F2 genetic-based algorithm for warfarin dosing: an Italian retrospective study. *Pharmacogenomics.* 2011;12:15-25.
22. Wen MS, Chang KC, Lee TH, Chen YF, Hung KC, Chang YJ, i sur. Pharmacogenetic dosing of warfarin in the Han-Chinese population: a randomized trial. *Pharmacogenomics.* 2017;18:245–253.
23. Gong IY, Schwarz UI, Crown N, Dresser GK, Lazo-Langner A, Zou G, i sur. Clinical and genetic determinants of warfarin pharmacokinetics and pharmacodynamics during treatment initiation. *PLoS One.* 2011;6:e27808.
24. Shaw K, Amstutz U, Kim RB, Lesko LJ, Turgeon J, Michaud V, i sur. Clinical practice recommendations on genetic testing of CYP2C9 and VKORC1 variants in warfarin therapy. *Ther Drug Monit.* 2015;37:428–436.
25. Fleming I. Cytochrome p450 and vascular homeostasis. *Circ Res.* 2001;89:753-762.
26. Fisslthaler B, Popp R, Kiss L, Potente M, Harder DR, Fleming I, i sur. Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries. *Nature.* 1999;401:493-497.
27. Enayetallah AE, French RA, Thibodeau MS, Grant DF. Distribution of soluble epoxide hydrolase and of cytochrome P450 2C8, 2C9, and 2J2 in human tissues. *J Histochem Cytochem.* 2004;52:447-454.
28. Spiecker M, Liao JK. Vascular protective effects of cytochrome p450 epoxygenase-derived eicosanoids. *Arch Biochem Biophys.* 2005;433:413-420.

29. Fleming I, Busse R. Endothelium-derived epoxyeicosatrienoic acids and vascular function. *Hypertension*. 2006;47:629-633.
30. Spector AA, Gary D, Snyder NL. Epoxyeicosatrienoic acids (EETs): metabolism and biochemical function. *Progr Lipid Res*. 2004;43:55-90.
31. Node K, Ruan XL, Dai J, Yang SX, Graham L, Zeldin DC, et al. Activation of G-proteins mediates induction of tissue-type plasminogen activator gene transcription by epoxyeicosatrienoic acids. *J Biol Chem*. 2001;276:15983-15989.
32. Dyar R, Hall S, McIntyre B. Warfarin prescription and administration: reducing the delay, improving the safety. *BMJ Qual Improv Reps*. 2015;4.

## **Životopis**

Kristina Krželj rođena je 8. svibnja 1993. godine u Livnu u Bosni i Hercegovini gdje je završila osnovnu školu i gimnaziju. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisala je 2012. godine. Nagrađena je Dekanovom nagradom za najbolju studenticu u akademskoj godini 2013./2014. Radila je kao student demonstrator na katedrama za anatomiju, patofiziologiju, internu medicinu i pedijatriju. Aktivno je sudjelovala na nekoliko znanstvenih projekata na Klinici za bolesti srca i krvnih žila, Kliničkoj jedinici za farmakogenomiku i individualizaciju terapije i na Klinici za kardijalnu kirurgiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb. U akademskoj godini 2016./2017. obavljala je praksu na odjelu dječje kardiologije i dječje kardijalne kirurgije Centra za srce Sveučilišne bolnice Hamburg Eppendorf, Njemačka. Dobitnica je nekoliko stipendija Sveučilišta u Zagrebu i Zaklade Adris u kategoriji darovitih studenata.